

# АМИЛОИДНАЯ И ТАУ-ПАТОЛОГИЯ МОЗГА В НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА ПРИ АКТИВАЦИИ ЭНТОРИНАЛЬНОЙ КОРЫ НА МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА И В УСЛОВИЯХ ПРОТЕКЦИИ ГАЛАРМИНОМ

ВАРДАНЫАН А.В.<sup>1</sup>, КАРАПЕТЯН К.В.<sup>1</sup>, АЛИЕВА М.Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии им. Л.А. Орбели Национальной академии наук Республики Армения, г. Ереван, Республика Армения

<sup>2</sup>Западно-Казахстанский государственный медицинский университет им. Марата Оспанова, г. Актобе, Республика Казахстан

Вестник ВГМУ. – 2017. – Том 16, №5. – С. 84-89.

## AMYLOID AND TAU BRAIN PATHOLOGY IN HIPPOCAMPAL NEURONS ON THE ACTIVATION OF ENTORHINAL CORTEX ON THE MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE AND IN THE CONDITIONS OF PROTECTION WITH GALARMIN

VARDANYAN A.V.<sup>1</sup>, KARAPETYAN K.V.<sup>1</sup>, ALIEVA M.B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>L.A. Orbeli Institute of Physiology of the Armenian National Academy of Sciences, Erevan, Republic of Armenia

<sup>2</sup>West Kazakhstan State Medical University named after Marat Ospanov, Aktobe, Kazakhstan

Vestnik VGMU. 2017;16(5):84-89.

### Резюме.

Проведен сравнительный анализ импульсной активности одиночных нейронов гиппокампа при высокочастотной стимуляции энторинальной коры на модели болезни Альцгеймера (205 клеток, n=2) и в условиях протекции-ей галармином (73 клеток, n=2) на 12 неделе выдерживания животных. На экспериментальной модели болезни Альцгеймера и в сочетании с протекцией галармином спустя 12 недель отведение активности одиночных нейронов гиппокампа при высокочастотной стимуляции энторинальной коры и гиппокампа с on-line селекцией и программным математическим анализом выявило формирование возбудительных и депрессорных ответов в виде тетанической депрессии и тетанической потенциации, комбинируемых в однонаправленные (ТД ПТД, ТП ПТП) и разнонаправленные (ТД ПТП, ТП ПТД) последовательности. Результаты исследований по применению обогащенных пролином пептидов позволяют считать галармин или PRP-1 иммуномодулятором-нейрогормоном и протектором широкого действия.

*Ключевые слова:* болезнь Альцгеймера, энторинальная кора, галармин.

### Abstract.

The research was conducted on the model of Alzheimer's disease (AD) and in the conditions of protection with galarmin. The comparative analysis of the impulse activity of the single hippocampal neurons on high-frequency stimulation of the entorhinal cortex on the AD model (205 cells, n=2) and in the conditions with the galarmin protection (73 cells, n=2) on the 12th week of animals keeping was made. In the present experiments, on the AD model and in the combination with the galarmin protection after 12 weeks, the diversion of the activity of single hippocampal neurons on high-frequency stimulation of the entorhinal cortex and hippocampus on-line selection and program mathematical analysis revealed the formation of excitative and depressor responses in the form of TD and TP combined into one- (TD PDD, TP PTP) and multidirectional (TD PTP, TP PDD) sequence. The results of the studies on the use of proline enriched peptides allow us to consider galarmin or PRP-1 as an immunomodulator-neurohormone and a broad-spectrum protector.

*Key words:* Alzheimer's disease, entorhinal cortex, galarmin.

Когортные исследования свидетельствуют о 10-15 новых случаях на тысячу человеко-лет для всех типов деменции и 5-8 случаях болезни Альцгеймера (БА), что составляет приблизительно половину от общего числа ежегодных диагнозов [1, 2]. Пожилой возраст является главным фактором риска заболевания: на каждые пять лет после 65-летия риск увеличивается примерно вдвое, вырастая от 3 случаев в 65 лет до 69 случаев на тысячу человеко-лет к 95 годам [1, 2]. Согласно гипотезе «амилоидного каскада» в головном мозге (в особенности в гиппокампе и коре мозга), ассоциированное со старением неравномерное распределение продуцирования и/или очистки бета-амилоидов (Аβ) приводит к постепенной аккумуляции и агрегации пептида, инициирующего нейродегенеративный каскад, который включает отложение амилоида, воспаление, повреждение и гибель нейронов [3]. В поддержку гипотезы «амилоидного каскада» исследования на животных моделях показали, что олигомерные и фибриллярные формы Аβ вызывают нарушение длительной потенциации, синаптическую дисфункцию и ускоряют формирование нейрофибриллярных нитей, что в конечном счете вызывает синаптическую недостаточность и гибель нейронов [4]. Аβ рассматривается как главный патогенный фактор БА. Однако, по мнению некоторых авторов, эта гипотеза недостаточно полно объясняет патогенез БА [5], тем более, что большинство клинических испытаний, нацеленных на снижение уровня Аβ, оказались неудачными. Помимо того, Аβ вырабатываются в здоровом мозге в процессе нейрональной активности и необходимы для обеспечения синаптической пластичности и памяти. Авторы предлагают модель, интерпретирующую патогенез БА как альтерацию петли негативной обратной связи между Аβ и его физиологическими рецепторами. Согласно этим представлениям, когда Аβ не может осуществлять свою физиологическую функцию и обеспечение механизма негативной обратной связи, происходит компенсаторное увеличение его выработки, избыточная аккумуляция и редукция функции альфа-7-никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (α7-nAChRs), что приводит к синаптической дисфункции и нарушениям памяти. Таким образом неизбежное действие Аβ не допускает ухудшение нейронального гомеостаза, а также нарушений памяти. Уточнение физиологической роли Аβ может оказаться чрезвычайно важным для понимания патогенеза БА [5]. Гипотеза «ами-

лоидного каскада» предполагает, что Аβ является первоначальным патологическим признаком при БА, ведущим к формированию экстраклеточных сенильных бляшек, тау-иммунореактивных нейрофибриллярных клубков, нейрональным потерям и, в конечном счете, клинической деменции [6]. Тем не менее некоторые авторы критически анализируют роль амилоидного прекурсорного протеина (APP), сенильных бляшек и тау-иммунореактивных нейрофибриллярных клубков и их отношение к развитию клинической деменции. Тем более, что лечение БА с позиций упомянутой гипотезы оказалось неудачным. Предлагается модификация этой гипотезы, которая может дать более полное объяснение патогенеза БА [6]. APP всесторонне изучался как прекурсор Аβ при БА. Однако существует мнение, что функция APP в норме до конца не ясна [7]. APP, вероятно, участвует в развитии стволовых клеток, нейрональном выживании и нейровосстановлении. Однако механизмы этого процесса не раскрыты. Имеется подтверждение того, что APP участвует как внутри-, так и экстраклеточно в регуляции различных сигнальных трансдукционных механизмов [7].

Целью исследования явилось выявление микроэлектрофизиологических критериев нарушения соотношения постстимульных возбудительных и депрессорных проявлений синаптической активности в нейронах гиппокампа, а также в отделах мозга, ведающих кратковременной (первичной) и долговременной (вторичной, третичной) памятью при высокочастотной стимуляции (ВЧС) энторинальной коры и гиппокампа на амилоидной модели БА (индуцированной интравентрикулярным введением токсического олигомера Аβ 25-35) на фоне воздействия галармина для оценки его протекторной активности.

### Материал и методы

Исследования проведены на 12 половозрелых крысах-самцах Альбино, массой 200-250 г в 3 сериях экспериментов – на интактных животных; на амилоидной модели БА, индуцированной билатеральным интрацеребральным введением Аβ 25-35; на фоне протекции галармином (обогащенного пролином пептида – PRP-1), из расчета 10γ/100 г (со следующего дня 7 инъекций через день). До острого эксперимента крысы выдерживались 12 недель. После истечения указанного срока у животных с БА производили внеклеточную регистрацию фоновой и вызванной спайко-

вой активности одиночных нейронов гиппокампа при ВЧС энторинальной коры и зоны СА1 гиппокампа, соответственно. Предварительно животные обездвигивались 1% дитилином (25 мг/кг внутривенно) и переводились на искусственное дыхание. Активность проявлялась в виде тетанической потенциации (ТП) и тетанической депрессии (ТД) с последующей посттетанической потенциацией (ПТП) и депрессией (ПТД) различной латентности, выраженности и длительности. Проводили программный математический анализ одиночной спайковой активности 366 нейронов гиппокампа ( $n=366$ ). Постстимульные проявления активности оценивали посредством on-line регистрации и программного математического анализа, позволяющего селекцию спайков амплитудной дискриминации с выводом «растеров» перистимульного спайкинга нейронов, построением гистограмм суммы и диаграмм усредненной частоты спайков (разработчик В.С. Каменецкий). Кроме того, строили суммированные и усредненные перистимульные (PETH Average) гистограммы и гистограммы частоты (Frequency Average) с вычислением средней частоты спайков. Далее производили многоуровневую статистическую обработку в отдельности для пре- и постстимульного отрезков времени и периода ВЧС. Для сравниваемых групп спайкинга нейрональной активности строили суммированные и усредненные перистимульные (PETH Average) гистограммы и гистограммы частоты (Frequency Average) с вычислением средней частоты спайков.

## Результаты и обсуждение

Проведен сравнительный анализ импульсной активности одиночных нейронов гиппокампа при ВЧС энторинальной коры на модели БА (205 клеток,  $n=2$ ) и с протекцией галармином (73 клеток,  $n=2$ ) на 12 неделе выдерживания животных. В нейронах гиппокампа на ВЧС энторинальной коры в депрессорной последовательности после 12 недель, по сравнению с престимульным уровнем, выявлена 3.0-кратная ТД, в то время как в норме она достигала 7-кратных изменений. В депрессорно-возбудительной последовательности имело место 7.0-кратное снижение престимульной активности, в то время как в норме отмечалось 6.0-кратное (рис. 1 А, группы А-Г). В нейронах гиппокампа на ВЧС энторинальной коры на модели БА в условиях протекции галармином ТД

в ТД ПТД исчислялась в пределах 2.35-кратного снижения, ниже нормы (7-кратное уменьшение), а ТД в ТД ПТП – 2-кратного снижения, что также ниже нормы (6-кратное снижение) (рис. 1Б, группы А-Г).

Постстимульные возбудительные эффекты изменялись следующим образом. На модели БА ТП в ТП ПТП достигала 8.5-кратного увеличения, что намного выше нормы (4.5-кратное), а ТП с ПТД – 3.0-кратного увеличения, что ниже нормы (10-кратное) (рис. 1 В, группы А-Г). В нейронах гиппокампа при ВЧС энторинальной коры на модели БА в условиях протекции галармином ТП в ТП ПТП исчислялась в пределах лишь 1.5-кратного увеличения, что ниже нормы (4.5-кратное), а ТП в ТП ПТД увеличивалась 2.0-кратно, что значительно ниже нормы (10-кратное увеличение) (рис. 1 Г, группы А-Г). Иными словами, на модели БА без протекции лишь значения ТД в сочетании с ПТП и ТП в ТП ПТП превышали норму, а в остальных случаях не достигли ее. В условиях же протекции во всех случаях значения не достигали нормы, а ТП в ТП ПТД – даже 5-кратно. При сравнении модели БА с протекцией и без нее – превалирования значений в условиях протекции не наблюдалось, в особенности в отношении ТД ПТП и ТП ПТП (где различия были 4-кратными и 5.66 кратными соответственно). На модели БА в сочетании с протекцией галармином спустя 12 недель отведение активности одиночных нейронов гиппокампа при ВЧС энторинальной коры и гиппокампа с on-line селекцией и программным математическим анализом выявило формирование возбудительных и депрессорных ответов в виде ТД и ТП, комбинируемых в однонаправленные (ТД ПТД, ТП ПТП) и разнонаправленные (ТД ПТП, ТП ПТД) последовательности. В нейронах гиппокампа при ВЧС энторинальной коры на модели БА в контроле значения ТД и ТП превышали норму лишь в сочетании с ПТП. С использованием протекции их значения не достигали нормы во всех постстимульных последовательностях, а ТП в ТП ПТД отличались даже 5-кратно. В сравнении с контролем также в условиях протекции не отмечалось превалирования значений (в особенности – в отношении ТД ПТП и ТП ПТП, где различия были 4-кратными и 5.66-кратными, соответственно).

На модели БА без протекции и в условиях протекции углубление ТД в гипоталамо-амигдаллярной проекции выше нормы, полагаемой в качестве протекторной (в особенности в депрессор-

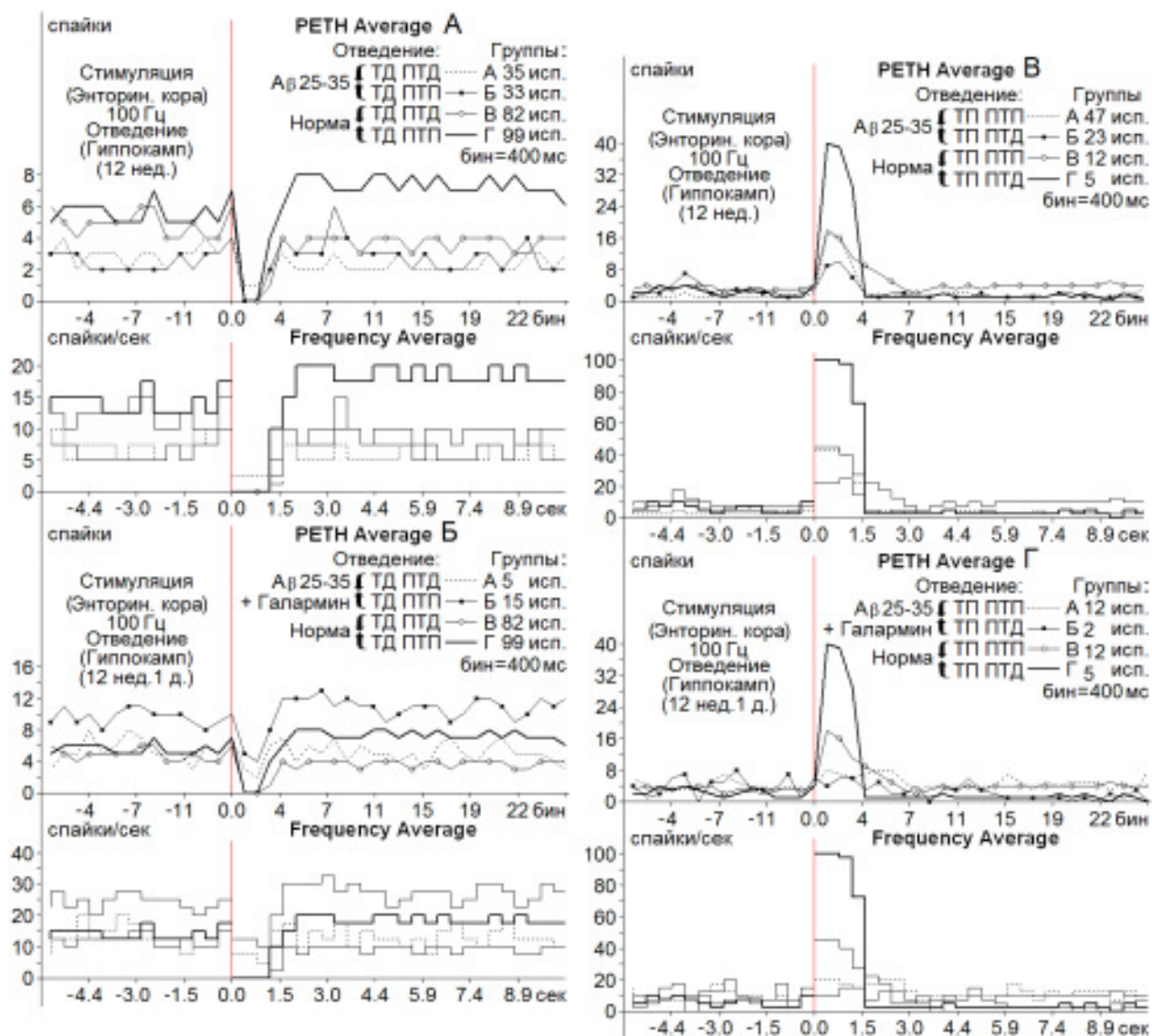


Рисунок 1 – А-Г – усредненные перистимульные гистограммы (PETN Average) депрессорных (группы А, В), депрессорно-возбудительных (группы Б, Г), возбудительных (группа А, В) и возбудительно-депрессорных (группа Б, Г) постстимульных тетанических и посттетанических проявлений активности нейронов гиппокампа при ВЧС энторинальной коры на модели БА (А, В) и в условиях протекции галармином (Б, Г).

но-возбудительной последовательности), следует считать успешным в аспекте противодействия нейродегенерации, в том числе эксайтотоксичности. Указанные изменения в возбудительных постстимульных проявлениях активности, по-видимому, можно отнести к нейтрализации эксайтотоксичности благодаря как компенсаторным возможностям мозга, так и эффективности поддержавшей их терапии. Результаты исследований по применению обогащенных пролином пептидов позволяют считать галармин или PRP-1 иммуномодулятором-нейрогормоном и протек-

тором широкого действия [8-11]. Известно морфо-функциональное доказательство протекторного действия галармина на нейроны спинного мозга, подверженные острой и хронической неспецифической нейродегенерации центрального и периферического происхождения у крыс [12]. Протекторное действие галармина проявлялось уже ко 2-3 неделе после травматических повреждений. Данные получили морфологическое (иммуно- и гистохимическое) подтверждение: галармин противодействовал формированию рубца, способствовал сращению перерезанных

нервных волокон, предотвращал дегенерацию нейронов и способствовал пролиферации глии [12]. Представляет интерес выраженное протекторное воздействие галармина на модели болезни Паркинсона, а также на моделях БА, но с вовлечением лишь гиппокампа [13, 14]. Настоящие исследования по применению Галармина на модели БА в широком спектре с вовлечением структур как кратковременной (гиппокамп), так и долговременной (амигдала и базальное ядро Мейнерта) памяти позволяют считать, что при своевременном и энергичном лечении значительная часть клеточных морфо-функциональных изменений может быть обратимой. Это позволяет считать возможным с завершением преклинических исследований по использованию галармина предложить выдвижение использования его протекторных возможностей для клинической апробации.

## Заключение

На экспериментальной модели болезни Альцгеймера и в сочетании с протекцией галармином спустя 12 недель отведение активности одиночных нейронов гиппокампа при высокочастотной стимуляции энторинальной коры и гиппокампа с on-line селекцией и программным математическим анализом выявило формирование возбуждающих и депрессорных ответов в виде ТД и ТП, комбинируемых в однонаправленные (ТД ПТД, ТП ПТП) и разнонаправленные (ТД ПТП, ТП ПТД) последовательности. Результаты исследования подтверждают свойства галармина или PRP-1 как иммуномодулятора-нейрогормона и протектора широкого действия.

## Литература

1. Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain / F. Bermejo-Pareja [et al.] // J. Neurol. Sci. – 2008 Jan. – Vol. 264, N 1/2. – P. 63–72.
2. Incidence of dementia, Alzheimer's disease, and vascular dementia in Italy. The ILSA Study / A. Di Carlo [et al.] //

- J. Am. Geriatr. Soc. – 2002 Jan. – Vol. 50, N 1. – P. 41–48.
3. Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics / J. Hardy, D. J. Selkoe // Science. – 2002 Jul. – Vol. 297, N 5580. – P. 353–356.
4. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory / G. M. Shankar [et al.] // Nat. Med. – 2008 Aug. – Vol. 14, N 8. – P. 837–842.
5. The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in Ab physiology / D. Puzzo [et al.] // Neuroscience. – 2015 Oct. – Vol. 307. – P. 26–36.
6. Armstrong, R. A. A critical analysis of the amyloid cascade hypothesis / R. A. Armstrong // Folia Neuropathol. – 2014. – Vol. 52, N 3. – P. 211–225.
7. Dawkins, E. Insights into the physiological function of the  $\beta$ -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease / E. Dawkins, D. H. Small // J. Neurochem. – 2014 Jun. – Vol. 129, N 5. – P. 756–769.
8. Априкян, В. С. Иммунопротективные свойства нового гипоталамического полипептида при бактериальных патологиях / В. С. Априкян, А. А. Галоян // Мед. наука Армении. – 1999. – Т. 39, № 2. – С. 23–29.
9. Априкян, В. С. Иммунокорректирующие свойства нового гипоталамического полипептида при макрофаг ассоциированных бактериальных дисфункциях / В. С. Априкян, А. А. Галоян // Мед. наука Армении. – 1999. – Т. 39, № 4. – С. 29–36.
10. Galoyan, A. A. Hypothalamic polypeptides protects mice from lethal challenge with Gram-negative bacteria / A. A. Galoyan, V. S. Aprikian // Neurochim (RAS & NAS RA). – 2000. – Vol. 17. – P. 60–63.
11. Protective Effect of a New Hypothalamic Peptide Against Cobra Venom and Trauma Induced Neuronal Injury / A. A. Galoyan [et al.] // Neurochem. Res. – 2001 Sep. – Vol. 26, N 8/9. – P. 1023–1038.
12. Исследование протективного эффекта нейросекреторных цитокинов на спинномозговые моно- и интернейроны после перерезки седалищного нерва / Р. М. Сулханян [и др.] // Нейрохимия. – 2003. – Т. 20, № 2. – С. 146–160.
13. Исследование протекторного эффекта нового гипоталамического обогащенного пролином пептида PRP-1 на морфо-функциональные изменения в гиппокампе крыс на модели болезни Альцгеймера, вызываемой интрацеребровентрикулярным введением бета-амилоидного пептида AP (23-25) / А. А. Галоян [и др.] // Нейрохимия. – 2004. – Т. 21, № 4. – С. 265–288.
14. Neuroprotective action of proline-rich polypeptide-1 in  $\beta$ -amyloid induced neurodegeneration in rats / K. Yenkovyan [et al.] // Brain. Res. Bull. – 2011 Oct. – Vol. 86, N 3/4. – P. 262–271.

Поступила 22.05.2017 г.

Принята в печать 10.10.2017 г.

## References

1. Bermejo-Pareja F, Benito-León J, Vega S, Medrano MJ, Román GC. Incidence and subtypes of dementia in three elderly populations of central Spain. J Neurol Sci. 2008 Jan 15;264(1-2):63-72. doi: 10.1016/j.jns.2007.07.021

2. Di Carlo A, Baldereschi M, Amaducci L, Lepore V, Bracco L, Maggi S, et al. Incidence of dementia, Alzheimer's disease, and vascular dementia in Italy. The ILSA Study. J Am Geriatr Soc. 2002 Jan;50(1):41-8.
3. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics.

- Science. 2002 Jul;297(5580):353-6.
4. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*. 2008 Aug;14(8):837-42. doi: 10.1038/nm1782
5. Puzzo D, Gulisano W, Arancio O, Palmeri A. The keystone of Alzheimer pathogenesis might be sought in Ab physiology. *Neuroscience*. 2015 Oct;307:26-36. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.08.039
6. Armstrong RA. A critical analysis of the amyloid cascade hypothesis. *Folia Neuropathol*. 2014;52(3):211-25.
7. Dawkins E, Small DH. Insights into the physiological function of the  $\beta$ -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2014 Jun;129(5):756-69. doi: 10.1111/jnc.12675
8. Aprikyan VS, Galoyan AA. Immunoprotective properties of a new gipotalaichesky polypeptide at bacteriemic pathologies. *Med Nauka Armenii*. 1999;39(2):23-9. (In Russ.)
9. Aprikyan VS, Galoyan AA. Immunocorrective properties of a new hypothalamic polypeptide in macrophage-associated bacterial dysfunctions. *Med Nauka Armenii*. 1999;39(4):29-36. (In Russ.)
10. Galoyan AA, Aprikyan VS. Hypothalamic polypeptides protects mice from lethal challenge with Gram-negative bacteria. *Neurochim (RAS NAS RA)*. 2000;17:60-3.
11. Galoyan AA, Sarkissian JS, Kipriyan TK, Sarkissian EJ, Chavushyan EA, Sulkhanyan RM, et al. Protective Effect of a New Hypothalamic Peptide Against Cobra Venom and Trauma Induced Neuronal Injury. *Neurochem Res*. 2001 Sep;26(8-9):1023-38.
12. Sulkhanyan RM, Sarkisyan DzhS, Chavushyan VA, Gevorkyan AZh, Avakyan ZE, Avetisyan ZA, i dr. Study of the protective effects neurosecretory cytokines on spinal mono - and interneurons after transection of the sciatic nerve. *Neirokhiimiia*. 2003;20(2):146-60. (In Russ.)
13. Galoyan AA, Sarkisyan DzhS, Chavushyan VA, Abramyan SS, Avakyan ZE, Vagradyan AG, i dr. Study of the protective effect of a new hypothalamic Proline-enriched peptide PRP-1 on morpho-functional changes in the hippocampus of rats in models of Alzheimer's disease, caused by intracerebroventricularly the introduction of beta-amyloid peptide AP (23-25). *Neirokhiimiia*. 2004;21(4):265-88. (In Russ.)
14. Yenkovyan K, Safaryan K, Chavushyan V, Meliksetyan I, Navasardyan G, Sarkissian J, et al. Neuroprotective action of proline-rich polypeptide-1 in  $\beta$ -amyloid induced neurodegeneration in rats. *Brain Res Bull*. 2011 Oct;86(3-4):262-71. doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.08.003

Submitted 22.05.2017

Accepted 10.10.2017

#### Сведения об авторах:

Варданян А.В. – к.б.н., научный сотрудник лаборатории «Физиология компенсации функций ЦНС», врач-нейроэндокринолог, Институт физиологии им. Л.А. Орбели Национальной академии наук Республики Армения; Карапетян К.В. – младший научный сотрудник, Институт физиологии им. Л.А. Орбели Национальной академии наук Республики Армения; Алиева М.Б. – ординатор по специальности «Общая невропатология», Западно-Казахстанский государственный медицинский университет им. Марата Оспанова.

#### Information about authors:

*Vardanyan A.V. – Candidate of Biological Sciences, neuroendocrinologist, research officer, L.A. Orbeli Institute of Physiology of the Armenian National Academy of Sciences;*  
*Karapetyan K.V. – associate research officer; L.A. Orbeli Institute of Physiology of the Armenian National Academy of Sciences;*  
*Alieva M.B. – the first-year clinical resident (speciality «General neuropathology»), West Kazakhstan State Medical University named after Marat Ospanov.*

**Адрес для корреспонденции:** Республика Армения, 0028, г. Ереван, Институт физиологии им. Л.А. Орбели Национальной академии наук Республики Армения, лаборатория «Физиология компенсации функций ЦНС». E-mail: anahit5551786@mail.ru – Варданян Анаит Вазгеновна.

**Correspondence address:** Republic of Armenia, 0028, Erevan, L.A. Orbeli Institute of Physiology of the Armenian National Academy of Sciences, the Laboratory «Central nervous system function compensation physiology». E-mail: anahit5551786@mail.ru, +374 94 92 43 66 – Anahit V. Vardanyan.